

На правах рукописи

Жильников Дмитрий Игоревич

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
РАЗВИТИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В МОЛОЧНОМ ПЕРИОДЕ
ОНТОГЕНЕЗА ПРИ АКСЕЛЕРАЦИИ**

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

Томск – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Рыжавский Борис Яковлевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья ФГБНУ Томского НИМЦ РАН

Солонский Анатолий Владимирович

доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией нейробиологии ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Томский государственный университет"

Ходанович Марина Юрьевна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России).

Защита состоится «__» _____ 2022 года в __. __ часов на заседании диссертационного совета 21.2.096.03 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Мустафина Лилия Рамильевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Развитие головного мозга (ГМ), как в пренатальном, так и в постнатальном периодах онтогенеза, зависит от генетических и средовых факторов [Алтухов Ю.П., 2003; Григорьян Г.А., 2004; Chauhan A., Grissom M., 2013; Westwood J.A., et al., 2013; Nicolas S., et al., 2015; Григорьян Г.А. и соавт., 2021]. Этот процесс может замедляться, нарушаться при патологии беременности и многоплодной беременности, действии на организм плода и ребенка токсикантов, инфекционных агентов. С другой стороны, имеются публикации, свидетельствующие о том, что экспериментальная акселерация белых крыс, обусловленная сокращением численности пометов, сопровождается рядом признаков, свидетельствующих об опережающем развитии их ГМ [Рыжавский Б.Я., 2009, 2020]. Экспериментальная акселерация крыс в этих работах являлась следствием значительного уменьшения численности пометов, осуществленного через сутки после родов, которое могло обуславливать лучшую обеспеченность молоком матери, большим ее вниманием. В то же время, данные литературы свидетельствуют о том, что акселерация рассматривается как следствие возможного влияния целого ряда факторов [Котеров А.Н. и соавт., 2018]. В связи с этим, возникает вопрос о том, ускоряются ли темпы развития ГМ при других моделях акселерации. Можно полагать, что знание механизмов, обуславливающих ускорение темпов развития ГМ при экспериментальной акселерации, будет полезным при определении возможных подходов к профилактике и лечению отставания в развитии ГМ детей, родившихся недоношенными, маловесными и нередко имеющих в последующем сниженные интеллектуальные способности [Strauss R.S., 2000; Дементьева Г.М., 2007; Clayton P.E., et al., 2008; Räikkönen K., et al., 2009; Циркин В.И. и соавт., 2010].

Цель исследования: изучить влияние акселерации, обусловленной 1) «естественной» малочисленностью пометов, 2) экспериментальным уменьшением численности пометов в разные периоды онтогенеза, на массу ГМ, морфометрические и гистохимические показатели развития его коры у крыс в

молочном периоде онтогенеза.

Задачи исследования

1. Изучить морфологические особенности ГМ, морфометрические показатели развития неокортекса собственно теменной доли (СТД) и гиппокампа, отражающие темпы их развития, у 14-суточных крыс, при акселерации, обусловленной 1) «естественной» малочисленностью пометов, 2) уменьшением численности пометов вследствие удаления у матери одного рога матки, 3) экспериментальным сокращением численности пометов через одни сутки после родов.

2. Изучить морфологические особенности ГМ, морфометрические показатели развития неокортекса переднетеменной доли (ПТД), СТД и гиппокампа, отражающие темпы их развития, а также особенности поведения в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) у 30-суточных крыс, при акселерации, обусловленной 1) «естественной» малочисленностью пометов, 2) экспериментальным сокращением численности пометов через одни сутки и 14 суток после родов.

3. Изучить морфометрические и гистохимические особенности нейронов неокортекса и гиппокампа ГМ крыс-акселераторов в 14- и 30-суточном возрасте.

4. Сопоставить влияние экспериментальной акселерации, обусловленной 1) «естественной» малочисленностью пометов, 2) уменьшением численности пометов в результате удаления у матери одного рога матки, 3) уменьшением численности пометов через одни или 14 суток после родов, на массу ГМ и полушария, морфометрические и гистохимические показатели развития неокортекса ПТД, СТД и гиппокампа.

Научная новизна

В работе впервые описаны особенности развития ГМ крыс-акселераторов в молочном периоде онтогенеза при акселерации, обусловленной «естественной» малочисленностью пометов и экспериментальным сокращением их численности, и проведены их сопоставления. Установлено, что акселерация

крыс, обусловленная 1) «естественной» малочисленностью пометов, 2) экспериментальным уменьшением ее в результате удаления одного рога матки, 3) уменьшением численности пометов в возрасте одних суток, приводящим к однонаправленным морфологическим отличиям ГМ, свидетельствующим о его опережающем развитии в молочном периоде онтогенеза.

Впервые показано, что акселерация крыс, обусловленная сокращением численности пометов через 14 суток после родов, в отличие от уменьшения ее в возрасте одних суток, не приводит к появлению морфологических признаков опережающего развития ГМ у крыс в возрасте 30 суток.

Впервые установлены положительные корреляции показателей массы тела крыс в 1-, 7-, 14-, 21-суточном возрасте и массы ГМ и полушария в возрасте 30 суток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в работе, расширяют и детализируют информацию о средовых факторах, влияющих на развитие ГМ в раннем периоде постнатального онтогенеза. Они могут представлять интерес как для специалистов в области нейробиологии, изучающих механизмы регуляции развития ГМ, так и для врачей, педиатров и неонатологов, занимающихся лечением детей с отставанием развития ГМ. Полученные в работе материалы могут быть включены в лекции по гистологии, эмбриологии, физиологии, педиатрии в медицинских вузах при рассмотрении вопросов, посвященных онтогенетическому развитию ГМ.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено в лаборатории кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Дальневосточного государственного медицинского университета на белых крысах линии Вистар из пометов, составивших следующие группы: 1) «естественные» малочисленные пометы, 2) пометы с уменьшенной в результате удаления у матери одного рога матки численностью, 3) пометы, численность которых была уменьшена через одни сутки после родов, 4) пометы, в которых численность была уменьшена через 14 суток после родов и 5) контрольные

пометы. Животные из 1-й – 4-й групп имели признаки акселерации. Методы изучения ГМ животных (морфометрические, гистохимические, иммуногистохимические) позволяли исследовать и сравнивать показатели, отражающие уровень онтогенетического развития органа, его коры, нейронов неокортекса и гиппокампа у крыс контрольной и экспериментальной групп. Объективность полученных данных обеспечивалась применением компьютерной морфометрии, цитофотометрии, иммуноцитохимии.

Оценка полученных результатов осуществлена с учетом данных 373 литературных источников, анализе гистологических препаратов и их микрофотографий и обработки полученных данных с помощью дескриптивной статистики, корреляционного и кластерного анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Развитие крыс в пометах с экспериментально уменьшенной в неонатальном периоде (через сутки после родов) или в пометах с «естественной» или экспериментально вызванной малой численностью пометов в пре-, неонатальном и молочном периодах, приводит к их акселерации, сопровождающейся особенностями ГМ животных, совокупность которых свидетельствует об ускоренных темпах развития органа в возрасте 14 и 30 суток. Они включают в себя большую, чем в контроле, массу ГМ и его полушарий, а вместе с этим, морфометрические и гистохимические признаки ускоренного развития коры, нейронов неокортекса и гиппокампа. Данные отличия от контроля максимально выражены в ГМ крыс, у которых пре- и постнатальное развитие проходило в пометах малой численности («естественные» малочисленные пометы).

2. Экспериментальное уменьшение численности пометов через 14 суток после родов (молочный период онтогенеза), хотя и вызывает появление признаков акселерации крыс, не приводит к изменениям темпов роста массы ГМ и полушария, уменьшения численной плотности нейронов, повышения численной плотности глиоцитов, увеличения глионейрального соотношения в ПТД и СТД неокортекса ГМ крыс в возрасте 30 суток.

3. Изменения массы ГМ и полушарий, а также морфометрические и гистохимические отличия коры неокортекса и гиппокампа от контроля являются однонаправленными у 14- и 30-суточных крыс при акселерации, обусловленной уменьшением численности пометов через одни сутки после родов, удалением одного рога матки и «естественной» малочисленностью пометов.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством животных, исследованных в каждой экспериментальной группе, принадлежностью всех их к линии Вистар, содержанием их в условиях одного вивария, стандартными условиями обработки материала. Работа базируется на объективных методах морфологического анализа – компьютерной морфометрии и цитофотометрии, статистической обработке материала. Материалы исследования опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК.

Материалы по теме диссертационного исследования представлены на XXIII и XXIV краевых конкурсах молодых ученых Хабаровского края (2021 и 2022 г.), Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации» (г. Москва, 2019 г., 2021 г.), на «Аспирантских чтениях» в рамках II Дальневосточного международного медицинского конгресса (2021 г.).

Личный вклад соискателя

Автор в полном объеме выполнил экспериментальную часть диссертационного исследования, провел морфометрическую, гистохимическую обработку материала, исследовал показатели поведения крыс, провел статистический анализ полученных данных. Им осуществлялась их подготовка для представления на конференциях, а также для публикации статей.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ в журналах, рекомендованных ВАК для публикации диссертационных материалов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований,

заклучения, выводов, списка сокращений и библиографического указателя. Объем диссертации включает 215 страниц машинописного текста и содержит 36 таблиц, 54 рисунка, включающих 99 микрофотографий, 41 гистограмму. Список литературы состоит из 372 источников, в том числе 167 отечественных и 205 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на крысах линии Вистар (329 крыс), являвшихся потомством молодых (возраст – 3-3,5 месяца) самцов и самок. Изучался ГМ 5-, 14- и 30-суточных животных. 14-суточные животные включали в себя 17 пометов, составивших 4 группы. 1-я группа (контрольная, 14КГ) состояла из 56 крысят (26 самцов и 30 самок), рожденных в 6 пометах средней величины (число крысят в помете – 9-12). 2-я группа (малочисленные пометы, 14МП) включала в себя крысят из 3 малочисленных пометов (19 крысят – 10 самцов и 9 самок), в каждом из которых родилось по 5-8 крысят. 3-я группа (уменьшенные пометы, 14УП) состояла из 30 крысят (15 самцов и 15 самок), родившихся в 5 пометах средней численности. Количество крысят в помете было уменьшено через сутки после родов, в каждом помете оставлено по 6 животных (3 самца и 3 самки). 4-я группа (экспериментальные пометы, 14преНУП) состояла из крысят из 3 пометов, чья численность была экспериментально уменьшена в пре- и постнатальном периодах онтогенеза. Для уменьшения численности пометов в пренатальном периоде, в 2-месячном возрасте у самок удалялся правый рог матки. Оперативное вмешательство осуществлялось в асептических условиях под эфирным наркозом. Спаривание самок с интактными самцами проводилось через 1,5 месяца после операции. Число рожденных крысят в помете равнялось 7-8. Через сутки после родов число крысят в каждом помете уменьшали до 6.

30-суточные животные включали 23 помета. Животные были разделены на 5 групп. 1-я группа (контрольная группа, 30КГ) состояла из 75 крысят (40 самцов и 35 самок), рожденных в 7 пометах средней величины (число в помете – 9-12). 2-я группа (малочисленные пометы, 30МП) включала в себя 21 крысенка (12 самцов и 9 самок) из 4-х малочисленных пометов, родившихся в пометах малой численности (по 5-6 крысят). 3-я группа (пометы, уменьшенные через сутки после родов, 30УП) состояла из 36 крысят (19 самцов и 17 самок), родившихся в 6 пометах средней численности (9-12 крысят в помете), количество животных в них было уменьшено до 6 через одни сутки после родов. 4-я группа (пометы, уменьшенные через 14 суток после родов – 14-30УП) состояла из 24 крысят (11 самцов и 13 самок), родившихся в 4 пометах средней численности (9-12 крысят в помете), количество животных в них было уменьшено через 14 суток после родов до 6. 5-я группа (контроль к пометам, уменьшенным через 14 суток после родов – 14-30КГ) состояла из 29 крысят (15 самцов и 14 самок), родившихся в 3 пометах средней численности (9-11 крысят в помете). Кроме того, проведено иммуногистохимическое изучение пролиферативной активности в ГМ 5-суточных (n=9) и 14-суточных крыс из пометов средней численности (n=12).

Животные из всех экспериментальных и контрольных групп содержались в условиях одного вивария, воду и разнообразный корм получали в свободном доступе *ad libitum*. Содержание и последующая эвтаназия животных проводилась согласно действующему документу ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». У всех животных контрольных и экспериментальных групп определялась масса тела. После эвтаназии определяли массу их ГМ, правого полушария, гонад, надпочечников. У части крысят масса тела определялась в 1-, 7-, 14-, 21- и 30-суточном возрасте. Морфометрическим и гистохимическим исследованиям подвергался ГМ животных всех групп, причем в экспериментальных группах изучались все животные, а в группах контроля исследовали не менее 6 крысят из каждого помета, отобранных методом случайной выборки. Левое полушарие фиксировали в жидкости Карнуа, затем его разрезали в ПТД и СТД пользуясь

схемами В.М. Светухиной (1962) и атласом стереотаксических координат мозга крыс [Paxinos G., Watson C., 2005]. Материал заливали в парафин с последующим изготовлением срезов из ПТД и СТД толщиной 7 мкм на микротоме Leica. Срезы окрашивали 1 % метиленовым синим и галлоцианином по Эйнарсону.

Методы морфометрического исследования коры ГМ

Проводилось изучение препаратов ПТД и СТД, окрашенных метиленовым синим и галлоцианином, включавшее в себя:

1. Определение толщины коры и слоя I на препаратах, окрашенных метиленовым синим, по их измерению в 3 участках ПТД и СТД, при помощи окуляр-микрометра МОВ–15.

2. Определение численной плотности нейронов и глиоцитов производили в слоях II и V неокортекса ПТД и СТД. Для этого при помощи комплекса аппаратно-программного определения фотометрических параметров клеток «Мекос» (медицинские компьютерные системы) проводилось фотодокументирование 5 стандартных полей зрения, в каждом из которых определялось число нейронов и глиоцитов, в том числе отдельно сателлитоцитов. Затем производили расчет их среднего количества в площади среза, равной 10 000 мкм², и вычисление глионейрального и сателлитонейрального индексов.

3. Измерение площади сечения нейронов, их цитоплазмы, ядер и ядрышек в слое II и V неокортекса, а также в поле CA1 гиппокампа проводили на препаратах, окрашенных галлоцианином по Эйнарсону, при помощи комплекса «Мекос». Для этого, в каждой из исследуемых зон измеряли по 25 клеток не менее чем в 5 стандартных полях зрения.

Методы гистохимического исследования нейронов коры ГМ

Определение концентрации нуклеиновых кислот в цитоплазме пирамидных нейронов слоя II и V неокортекса ПТД и СТД, а также поля CA1 гиппокампа проводили с помощью комплекса «Мекос» на парафиновых срезах толщиной 7 мкм, окрашенных галлоцианином. Исследование проводилось в 5 стандартных полях зрения с измерениями не менее чем 25 клеток для каждого

случая. В нейронах этих же локализаций определяли активность НАДН-Д и НАДФН-Д по З. Лойда и соавт. (1982). Для этого, из правого полушария тотчас после эвтаназии крыс готовились коронарные срезы толщиной 20 мкм на криостатном микротоме «Leica CM1850». Срезы монтировали на покровные стекла, помещали в инкубационную среду на 30 минут в термостат (температура 37 °С). Инкубационная среда (реактивы – фирмы Sigma) готовилась по З. Лойда и соавт. (1982) в модификации Д.Э. Коржевского (1996). В 1 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН=7,4) вносилось 0,3 мг нитросинего тетразолия, 2 мг НАДН или НАДФН. Контрольные срезы инкубировали в среде, не содержащей НАДН или НАДФН. Оценка интенсивности гистохимических реакций осуществлялось по оптической плотности продуктов реакции в цитоплазме исследованных нейронов.

Иммуногистохимическое исследование маркера пролиферативной активности нейронов коры ГМ по экспрессии Ki67 включало в себя исследование головного мозга 5-, 14-суточных крыс. После эвтаназии животных ГМ фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде в течение 24 часов. Проведение иммунохимической реакции осуществлялось согласно протоколу, рекомендованному производителем (Leica). Препараты подвергались обзорному изучению, исследовалась доля Ki67-позитивных клеток в субвентрикулярной зоне боковых желудочков, зубчатой извилине и поле СА1 гиппокампа. Микрофотографии нейрогенных ниш и неокортекса импортировались в программу Видеотест – Морфология 5, в которой определяли долю Ki67-иммунопозитивных структур, рассчитывавшуюся как процент иммунопозитивных клеток к их общему числу в исследуемых зонах полушария.

Методы исследования высшей нервной деятельности (ВНД)

Поведение в ПКЛ изучалось у крыс из групп, морфология ГМ которых изучалась после эвтаназии в возрасте 30 суток, при достижении животными возраста 28 суток. Анализ ВНД включал фиксацию различных поведенческих актов (бездействие, принюхивание, выходы в открытые рукава и заходы в закрытые рукава, груминг, стойки, движения) в течение 3 минут.

Методы статистической обработки данных

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью программы Statistica 10, StatSoft, Inc.2011, с применением опций «дескриптивная статистика», «корреляционный анализ», «кластерный анализ». Определялись средняя арифметическая и ошибка средней ($M \pm m$). Межгрупповые различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$. Исследование связи между количественными признаками осуществлялось с помощью парного коэффициента линейной корреляции Пирсона (r). Для определения доверительного интервала использовался t -критерий Стьюдента и величина доверительной вероятности $P = 95\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Масса тела 14-суточных животных подопытных групп была значительно большей, чем в контроле. Масса семенников у животных экспериментальных групп также превышала ее у крыс контрольной группы. При этом отличия массы семенников от контроля были статистически значимы только в группе 14МП. По этим признакам животные имели важные признаки акселерации. Животные всех экспериментальных групп имели массу ГМ и полушарий достоверно большую, чем крысята контрольной группы (таблица 1). При этом акселерация отразилась на морфометрических показателях, закономерно меняющихся в процессе онтогенетического развития. Так, толщина коры у крыс из пометов 14МП и 14УП была больше, чем у крыс 14КГ, а у животных из 14преНУП – не имела достоверных отличий от контрольных показателей. При этом следует учитывать, что масса, а вместе с ней и размеры полушарий, у крысят подопытных групп были большими, чем у контрольных. Это дает основание полагать, что даже при ее толщине, равной контрольной, ее суммарный объем увеличен.

Численная плотность нейронов в слое II у крыс из всех экспериментальных групп была достоверно ниже, чем в контрольной. В слое V это наблюдалось только у животных из группы 14УП (таблица 1). Численная плотность глиоцитов, в том числе сателлитоцитов, в слое II ГМ крыс всех экспериментальных групп превышала эти показатели в контроле (таблица 1). В слое V численная плотность сателлитоцитов во всех экспериментальных группах статистически достоверных отличий от контрольной группы не имела. Вследствие этих изменений отношение глия/нейроны и сателлитоциты/нейроны в неокортексе СТД ГМ животных экспериментальных групп увеличивалось. Это может рассматриваться как фактор, обуславливающий условия для опережающего развития нейронов неокортекса в ГМ крыс-акселератов.

При изучении показателей, закономерно изменяющихся как в постнатальном онтогенезе, так и при изменениях функционального состояния ГМ, было выявлено, что у животных из группы 14преНУП имеется достоверное увеличение размеров нейронов и их ядер в слое II. Размеры ядрышек были увеличены ($P < 0,05$) в нейронах слоя II и V СТД и гиппокампа у крысят из групп 14МП и 14УП (таблица 1). Концентрация РНК в цитоплазме нейронов неокортекса и гиппокампа головного мозга крысят из группы 14УП была достоверно выше, чем в контрольной группе. В группе 14МП это выявлялось только в нейронах гиппокампа, в группе 14преНУП нейроны неокортекса и гиппокампа не имели достоверных отличий данного показателя от такового в группе 14КГ. Активность НАДН-Д в исследованных нейронах коры ГМ у животных всех экспериментальных групп была выше, чем у крысят контрольной группы. При этом статистически достоверные отличия наблюдались в гиппокампе у животных группы 14МП, слое II – в группе 14УП и нейронах слоя II и гиппокампа крысят группы 14преНУП.

Таким образом, ГМ 14-суточных крысят из исследованных экспериментальных групп имел признаки опережающего развития по целому ряду показателей, закономерно изменяющихся в постнатальном онтогенезе: массе органа, его полушарий, толщине коры, численной плотности глиоцитов и нейронов, морфометрическим и гистохимическим характеристикам последних.

Таблица 1 – Показатели развития ГМ 14-суточных крыс

экспериментальных и контрольной групп

Группа	Малочисленные пометы	Уменьшенные пометы	Экспериментально уменьшенные пре- и постнатально пометы	Контрольная группа
Показатели				
Масса тела, г	29,0±0,9	24,0±0,75	27,9±0,76	20,1±0,44
Масса ГМ, мг	1 192±14,6	1 150±12,8	1 143±17,3	1 071±10,9
Масса ГМ/масса тела, мг/г	41,3±1,0	48,9±0,87	41,2±0,78	54±0,96
Масса полушария, мг	471±8,9	439±7,0	449±8,5	412±5,5
Толщина коры, мкм	1 316±50,1	1 339±21,8	1 238±33,6	1 252±26,3
Толщина слоя I, мкм	120±7,1	113±3,6	126±4,9	115±3,6
Число нейронов в поле зрения				
слой II	25,2±0,43	26,4±0,27	25,9±0,46	28,9±0,49
слой V	7,6±0,18	7,2±0,11	7,4±0,19	7,8±0,13
Число глиоцитов в поле зрения				
слой II	11,1±0,32	11,1±0,44	11,3±0,23	8,7±0,14
слой V	8,2±0,39	9,3±0,25	8,5±0,17	8,4±0,16
Число сателлитоцитов в поле зрения				
слой II	2,3±0,09	2,3±0,09	3,2±0,14	1,8±0,05
слой V	1,8±0,11	1,7±0,11	1,8±0,07	2,0±0,09
Глионейральный индекс				
слой II	0,4±0,02	0,4±0,017	0,4±0,01	0,3±0,003
слой V	1,09±0,05	1,3±0,04	1,16±0,04	1,1±0,02
Сателлито-нейральный индекс				
слой II	0,09±0,004	0,09±0,004	0,12±0,006	0,06±0,002
слой V	0,24±0,02	0,24±0,015	0,24±0,008	0,25±0,01
Площадь сечения нейронов (мкм ²)				
слой II	108±3,6	102±2,9	111±2,2	100±1,8
слой V	184±7,5	176±4,6	172±3,0	171±2,9
гиппокамп	153±4,9	154±3,8	152±3,9	143±2,8
Площадь сечения цитоплазмы нейронов (мкм ²)				
слой II	40,2±1,3	38,0±1,6	38,7±0,9	38,3±1,2
слой V	62,7±3,5	53,9±3,5	61,3±1,9	61,4±1,4
гиппокамп	52,3±2,04	48,7±2,3	55,9±1,5	50,2±1,07
Площадь сечения ядер нейронов (мкм ²)				
слой II	67,4±2,6	63,9±2,2	71,8±1,6	61,7±1,2
слой V	121,2±4,6	119,3±4,9	110,9±2,3	110,4±1,9
гиппокамп	100,5±3,8	105,0±3,4	96,4±2,8	92,9±2,2
Площадь сечения ядрышек нейронов (мкм ²)				
слой II	3,9±0,19	4,7±0,23	3,7±0,14	3,4±0,08
слой V	4,9±0,36	6,7±0,38	4,0±0,13	3,9±0,06
гиппокамп	4,4±0,26	5,7±0,23	3,8±0,09	3,6±0,07
Концентрация РНК в цитоплазме нейронов (усл. ед.)				
слой II	0,347±0,020	0,410±0,005	0,307±0,013	0,336±0,012
слой V	0,321±0,031	0,414±0,009	0,327±0,016	0,333±0,010
гиппокамп	0,426±0,011	0,479±0,017	0,386±0,014	0,365±0,008
Активность НАДН-Д в цитоплазме нейронов (усл. ед.)				
слой II	0,438±0,051	0,437±0,013	0,434±0,038	0,346±0,014
слой V	0,471±0,067	0,441±0,012	0,431±0,044	0,372±0,02
гиппокамп	0,648±0,055	0,568±0,013	0,566±0,067	0,463±0,025
Активность НАДФН-Д в цитоплазме нейронов (усл. ед.)				
слой II	0,454±0,057	0,416±0,009	0,463±0,042	0,411±0,021
слой V	0,438±0,062	0,389±0,004	0,475±0,041	0,409±0,014
гиппокамп	0,734±0,088	0,491±0,012	0,515±0,024	0,569±0,023

Примечание: в таблицах **жирным шрифтом** отмечены статистически достоверные различия с контролем ($P < 0,05$).

При этом в разных экспериментальных группах характер этих отличий от контроля был однонаправленным, а межгрупповые различия в экспериментальных группах не были статистически достоверными (таблица 1).

У 30-суточных животных экспериментальных групп масса тела и гонад была достоверно большей, чем у контрольных. У крысят из групп 30МП и 30УП масса ГМ и полушарий также была больше, чем у контрольных животных (таблица 2). Сопоставление массы ГМ и полушарий у 14- и 30-суточных крыс показало, что их возрастное увеличение в экспериментальных пометах и группе контроля было близким по величине. Таким образом, в период от 14- до 30-суточного возраста увеличение массы ГМ и полушарий у экспериментальных групп животных не превышало его у крыс из контрольных пометов. Это говорит о том, что большая, чем в контроле, масса ГМ и полушарий у 30-суточных животных экспериментальных групп обуславливалась большей их величиной в возрасте 14-суток.

Корреляционный анализ показал, что между массой ГМ и полушария у 30-суточных крысят как контрольной, так и опытной группы имеется положительная корреляционная связь с массой тела животных в возрасте 7, 14, 21 и 30 суток. Коэффициент корреляции между массой тела крысят в возрасте 1 суток и массой ГМ и полушарий в 30-суточном возрасте был достоверным только у крыс контрольной группы ($r=0,63$ и $r=0,4$ соответственно), тогда как у животных опытной группы он не был статистически значимым ($r=0,25$ и $r=0,1$). Это можно рассматривать как свидетельство того, что уменьшение численности пометов, увеличившее темпы роста массы тела, обусловило снижение степени зависимости массы ГМ у месячных крысят этой группы от массы тела в возрасте одних суток.

Морфометрический анализ показал, что толщина СТД в экспериментальных группах не имела достоверных отличий от таковых в группе контроля. Численная плотность нейронов в слое II и V СТД была статистически достоверно снижена только в группе 30МП. Численная плотность глиоцитов в слое II и V СТД в ГМ крыс экспериментальных групп превышала эти показатели

в контроле. При этом в слое II имелось также увеличение численной плотности сателлитоцитов ($P < 0,05$). Эти изменения привели к статистически значимому увеличению отношения глия/нейроны и сателлитоциты/нейроны в коре ГМ животных экспериментальных групп. Параллельно с этим выявлялось достоверное увеличение, по сравнению с группой 30КГ, размеров перикарионов в слое II СТД в группе 30МП и 30УП, в слое V СТД в группе 30УП, в поле СА1 гиппокампа крыс группы 30МП и 30УП (таблица 2). Размеры ядер были статистически достоверно увеличены в нейронах слоя II СТД у животных из группы 30МП и 30УП, а также в слое V СТД и поле СА1 гиппокампа у крысят из группы 30УП. В ПТД наблюдались однонаправленные с описанными выше, статистически значимые различия коры ГМ крыс-акселератов и контрольных животных. В группе 30УП это сочеталось с достоверным увеличением толщины коры ПТД.

Исследованные корковые нейроны ГМ экспериментальных животных также имели отличия от контрольных показателей. Они включали в себя достоверное увеличение размеров перикарионов в слое II ПТД у крыс из группы 30МП, в слое V ПТД – у крыс из групп 30МП и 30УП. Размеры ядер были увеличены в нейронах коры слоя II и V ПТД у крыс из группы 30МП и 30УП, размеры ядрышек – в нейронах слоя II и V ПТД мозга крыс из группы 30МП ($P < 0,05$). Концентрация РНК в цитоплазме исследованных нейронов ГМ 30-суточных экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой была достоверно увеличена в цитоплазме нейронов слоя II неокортекса СТД в группе 30МП. Изучение активности НАДН-Д выявило ее повышение в цитоплазме нейронов слоя II и V СТД ($P < 0,05$) как в группе 30МП, так и в группе 30УП. В группе 30МП активность НАДФН-Д в слое V СТД была достоверно выше, чем в группе 30КГ (таблица 2).

Как указывалось выше, темпы увеличения массы ГМ и полушарий в возрастном интервале между 14-ми и 30-ми сутками у крыс экспериментальных групп, в которых имелась уменьшенная численность пометов, начиная с возраста одних суток (группа 30УП) или еще и в пренатальном периоде (группа 30МП), не отличались от наблюдавшегося у контрольных животных.

Таблица 2 – Показатели развития ГМ 30-суточных крыс экспериментальных и контрольной групп

Показатели	Малочисленные пометы	Уменьшенные пометы	Контрольная группа
Масса тела, г	77,2±1,9	81,6±2,1	66,3±1,2
Масса ГМ, мг	1 521±12,7	1 512±13,9	1 454±11,6
Масса ГМ/масса тела, мг/г	19,9±0,45	18,6±0,38	22,7±0,37
Масса полушария, мг	559±4,4	565±5,5	534±5,1
Толщина коры ПТД, мкм	1 560±43,1	1 718±16,8	1 585±24,8
Толщина слоя I ПТД, мкм	132±9,0	145±5,0	136±4,6
Толщина коры СТД, мкм	1 261±32,8	1 295±21,5	1 320±16,1
Толщина слоя I СТД, мкм	131±3,1	136±3,1	134±2,2
Число нейронов в поле зрения			
слой II ПТД	16,9±0,17	16,3±0,18	18,6±0,18
слой V ПТД	6,49±0,1	6,02±0,1	6,95±0,1
слой II СТД	18,2±0,26	19,2±0,3	19,9±0,29
слой V СТД	6,0±0,12	7,1±0,1	6,9±0,2
Число глиоцитов в поле зрения ПТД			
слой II ПТД	11,2±0,21	10,7±0,18	8,1±0,12
слой V ПТД	8,6±0,11	8,7±0,13	7,6±0,17
слой II СТД	11,0±0,24	10,7±0,11	8,5±0,11
слой V СТД	8,5±0,11	8,6±0,14	7,5±0,26
Число сателлитоцитов в поле зрения			
слой II ПТД	2,2±0,06	1,9±0,06	1,8±0,05
слой V ПТД	2,2±0,06	2,1±0,06	1,9±0,05
слой II СТД	2,2±0,06	2,1±0,06	1,8±0,05
слой V СТД	2,2±0,07	2,2±0,1	2,0±0,26
Глионейральный индекс ПТД			
слой II ПТД	0,66±0,01	0,66±0,01	0,43±0,007
слой V ПТД	1,3±0,22	1,5±0,031	1,1±0,003
слой II СТД	0,608±0,02	0,557±0,01	0,43±0,007
слой V СТД	1,441±0,041	1,236±0,022	1,126±0,026
Сателлито-нейральный индекс ПТД			
слой II ПТД	0,13±0,004	0,12±0,004	0,1±0,003
слой V ПТД	0,34±0,01	0,35±0,012	0,28±0,008
слой II СТД	0,119±0,004	0,111±0,003	0,093±0,002
слой V СТД	0,380±0,017	0,309±0,019	0,283±0,008
Площадь сечения нейронов (мкм ²)			
слой II ПТД	116±1,5	108±1,8	106±1,9
слой V ПТД	192±1,7	186±1,9	176±2,6
слой II СТД	114±1,5	108±1,9	103±1,4
слой V СТД	181±2,8	185±4,4	174±2,6
гиппокамп	138±1,4	128±3,6	115±1,8
Площадь сечения цитоплазмы нейронов (мкм ²)			
слой II ПТД	46±0,8	41±1,0	43±1,0
слой V ПТД	89±1,7	82±2,3	78±1,8
слой II СТД	45±0,8	39±1,1	41±0,7
слой V СТД	82±2,4	77±3,9	76±1,9
гиппокамп	68±1	44±2,0	48±0,9
Площадь сечения ядер нейронов (мкм ²)			
слой II ПТД	70±1,0	68±1,2	63±1,4
слой V ПТД	103±0,7	105±1,6	98±1,9
слой II СТД	69±1,0	68,7±1,4	61±0,9
слой V СТД	99±0,8	108±2,5	98±1,9
гиппокамп	70±0,9	85±3,2	67±1,5
Площадь сечения ядрышек нейронов (мкм ²)			
слой II ПТД	5,1±0,11	4,0±0,19	3,7±0,1
слой V ПТД	5,8±0,11	5,1±0,17	4,8±0,17
слой II	5±0,11	3,8±0,22	3,7±0,08
слой V	5,6±0,1	5,4±0,17	5,7±0,09
гиппокамп	5,4±0,11	4,2±0,21	4,2±0,08
Концентрация РНК в цитоплазме нейронов (усл. ед.)			
слой II ПТД	0,427±0,003	0,414±0,009	0,417±0,004
слой V ПТД	0,441±0,006	0,447±0,008	0,435±0,009

слой II	0,419±0,004	0,406±0,009	0,408±0,002
слой V	0,438±0,006	0,445±0,008	0,437±0,004
гиппокамп	0,439±0,011	0,454±0,007	0,449±0,01
Активность НАДН-Дв в цитоплазме нейронов (усл. ед.)			
слой II	0,425±0,013	0,372±0,01	0,343±0,007
слой V	0,471±0,012	0,455±0,01	0,414±0,009
гиппокамп	0,529±0,024	0,508±0,018	0,489±0,017
Активность НАДФН-Д в цитоплазме нейронов (усл. ед.)			
слой II	0,464±0,011	0,470±0,008	0,458±0,01
слой V	0,520±0,008	0,489±0,007	0,486±0,008
гиппокамп	0,646±0,014	0,641±0,014	0,629±0,017

В связи с этим возникал вопрос о том, приведет ли уменьшение численности пометов через 14 суток после родов к тем изменениям, которые вызывало их уменьшение через 1 сутки. Для ответа на него был поставлен эксперимент, в котором уменьшение (до 6 крысят) численности пометов было проведено через 14 суток после родов. При этом было установлено, что в 30-суточном возрасте крысы экспериментальной группы имели признаки акселерации: большую, чем в контроле, массу тела и гонад. В то же время, масса их ГМ, полушарий не имели достоверных отличий от имевшихся у контрольных животных. Не наблюдалось также уменьшения численной плотности нейронов, повышения численной плотности глиоцитов, увеличения глионейрального соотношения в ПТД и СТД неокортекса. Эти результаты показывают, что у крыс в течение молочного периода, по достижении ими возраста 14 суток, факторы, которые обуславливали увеличение темпов развития ГМ в результате уменьшения численности пометов в неонатальном (группа 14УП, 30УП) или в пренатальном и неонатальном периодах (группа 14МП, 30МП) онтогенеза, уже не оказывают данного эффекта. Можно предполагать, что это связано со значительными изменениями свойств клеток ГМ, происходящими в течение неонатального и молочного периодов, а также с возрастным уменьшением интенсивности пролиферативной активности в нейрогенных нишах ГМ. Подтверждением этого предположения являются и данные, полученные нами при изучении пролиферативной активности в головном мозге крыс контрольной группы, показавшие, что у 14-суточных животных в зубчатой извилине она уменьшалась в 3,2 раза по сравнению с наблюдавшейся у крыс в возрасте 5 суток ($P < 0,05$).

Выявленные морфологические особенности ГМ крыс-акселераторов сочетались с отличиями их поведения от поведения контрольных животных. Изучение поведения крыс в 28-суточном возрасте в ПКЛ выявило, что у

животных из групп 30МП и 30УП отличия от контроля были однотипными. Они включали в себя уменьшение времени движения, числа заходов в открытые и закрытые рукава, увеличение времени бездействия, числа и времени стоек, свешиваний, уменьшение времени нахождения в открытых рукавах и увеличения – пребывания в закрытых рукавах. Совокупность этих особенностей трактуется как увеличение «осторожности», снижение «исследовательской активности», которые находятся между собой в реципрокных взаимоотношениях [Ковалев Г.И. и соавт., 2019, 2020)].

Таким образом, ГМ крыс-акселератов исследованных экспериментальных групп отличался от ГМ контрольных животных по показателям 1) меняющимся практически только в связи с онтогенетическим развитием органа и 2) меняющимся как в процессе онтогенетического развития, так и при изменениях уровня функциональной активности нейронов. При этом характер межгрупповых отличий ГМ, его коры, у животных из различных экспериментальных групп от контрольных показателей зависел от возраста животных и различался у 14- и 30-суточных крыс. В то же время, можно констатировать, что ГМ крыс-акселератов из разных изученных экспериментальных групп имел «набор» одинаковых по направленности отличий от ГМ животных контрольных групп, совокупность которых может рассматриваться как свидетельство опережающего развития органа, его неокортекса и гиппокампа. При этом межгрупповые различия показателей развития ГМ крыс экспериментальных групп не были статистически значимыми.

ВЫВОДЫ

1. Морфологические показатели развития ГМ крыс в молочном периоде при акселерации, обусловленной 1) рождением в «естественных малочисленных» пометах, 2) малочисленностью пометов у самок с удаленным до беременности одним рогом матки, 3) выращиванием в пометах с экспериментальным уменьшением численности через одни сутки после родов, имеют отличия от показателей развития ГМ контрольных животных. Эти отличия у крыс данных экспериментальных групп являются однонаправленными, а их совокупность свидетельствует об опережающих темпах развития ГМ в неонатальном и молочном периодах онтогенеза. Межгрупповые различия большинства исследованных показателей развития ГМ у крыс разных экспериментальных групп не являются статистически достоверными.

2. Признаками, свидетельствующими об ускоренных темпах развития ГМ 14- и 30-суточных крыс при экспериментальной акселерации, обусловленной уменьшением численности пометов в течение эмбрионального, неонатального и молочного периодов, являются большая масса органа и полушария, меньшая численная плотность нейронов в неокортексе ПТД и СТД, большая численная плотность глиоцитов, увеличенное глионейральное отношение.

3. Нейроны неокортекса ГМ 14-суточных (группы 14МП, 14УП и 14преНУП) и 30-суточных (группы 30МП и 30УП) крыс с экспериментальной акселерацией имеют признаки опережающего развития по сравнению с этими нейронами у контрольных животных по морфометрическим (увеличение размеров перикарионов, цитоплазмы, ядер, ядрышек) и гистохимическим (бóльшая концентрация РНК в цитоплазме, более высокая активность НАДН-Д и НАДФН-Д) показателям. Данные отличия от контроля в разной степени выражены в корковых нейронах различной локализации в коре ГМ крыс экспериментальных групп. В совокупности они свидетельствуют о более высокой, чем в контроле, интенсивности синтетических процессов и биологического окисления в нейронах коры ГМ крыс-акселераторов.

4. Уменьшение численности пометов через 14 суток после родов, хотя и обуславливает акселерацию животных в возрасте 30 суток, не приводит к изменениям, характерным для опережающего развития ГМ: увеличению темпов роста массы ГМ и полушария, уменьшению численной плотности нейронов, повышению численной плотности глиоцитов, увеличению глионейрального соотношения в ПТД и СТД неокортекса крыс в возрасте 30 суток.

5. Поведение крыс-акселераторов, морфология ГМ которых изучалась при достижении ими 30-суточного возраста, в возрасте 28 суток отличается от поведения контрольных животных. В ПКЛ эти отличия однотипны в

экспериментальных группах 30МП и 30УП и включают в себя уменьшение времени движения, нахождения в открытых рукавах, свешиваний, увеличение времени бездействия, пребывания в закрытых рукавах, стоек.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из списка, рекомендованного ВАК:

1. Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И. Влияние пренатального и постнатального уменьшения численности пометов на некоторые показатели развития головного мозга крыс в молочном периоде онтогенеза // **Дальневосточный медицинский журнал.** – 2019. – № 3. – С. 57-60. **Импакт фактор по РИНЦ – 0,479.**

2. Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И., Литвинцева Е.М. Морфологические особенности развития головного мозга крыс из пометов различной численности в молочном и препубертатном периодах онтогенеза // **Дальневосточный медицинский журнал.** – 2019. – № 4. – С. 24-28. **Импакт фактор по РИНЦ – 0,479.**

3. Рыжавский Б.Я., Малофей Ю.Б., Цекатунов Д.А., Жильников Д.И. Иммуногистохимическая характеристика пролиферативного потенциала в головном мозге крыс в неонатальном и молочном периоде // **Дальневосточный медицинский журнал.** – 2020. – № 1. – С. 66-69. **Импакт фактор по РИНЦ – 0,479.**

4. Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И. Анализ зависимости морфологических показателей развития головного мозга крыс в месячном возрасте от динамики массы тела в неонатальном и молочном периодах онтогенеза // **Дальневосточный медицинский журнал.** – 2021. – № 2. – С. 37-40. **Импакт фактор по РИНЦ – 0,479.**

5. Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И. Зависимость некоторых показателей развития головного мозга 30-дневных крыс от динамики массы тела в неонатальном и молочном периодах в помётах разной численности // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2021. – Т. 171, № 5. – С. 645-650. **Импакт фактор по РИНЦ – 0,804.**

6. Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И. Влияние экспериментального сокращения численности помётов у крыс в неонатальном и молочном периодах онтогенеза на некоторые показатели развития их головного мозга в 30-дневном возрасте // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2021. – Т. 172, № 10. – С. 509-514. **Импакт фактор по РИНЦ – 0,804.**

7. Жильников Д.И., Рыжавский Б.Я. Некоторые особенности головного мозга крыс линии Вистар, развивавшихся в помётах различной численности // **Тихоокеанский медицинский журнал.** – 2022. – Т. 87, № 1. – С. 79-84. **Импакт фактор по РИНЦ – 0,810.**

8. Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И., Лазинская О.В. Влияние сокращения численности пометов в неонатальном периоде, через разные сроки после родов, на показатели развития головного мозга крыс // **Бюллетень экспериментальной**

биологии и медицины. – 2022. – Т. 173, № 4. – С. 486-492. Импакт фактор по РИНЦ – 0,804.

9. Рыжавский Б.Я., Жильников Д.И., Лазинская О.В., Литвинцева Е.М., Матвеева Е.П. Соотношение особенностей развития головного мозга крыс в разном возрасте дорепродуктивного периода и его ускорения при экспериментальном уменьшении численности помётов // **Дальневосточный медицинский журнал. – 2022. – № 2. – С. 34-39. Импакт фактор по РИНЦ – 0,479.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

14КГ – группа 14-суточных крыс из помётов средней численности (контрольная группа).

14МП – группа 14-суточных крыс из малочисленных помётов.

14преНУП – группа 14-суточных крыс из помётов, уменьшенных в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза.

14УП – группа 14-суточных крыс из помётов средней численности, уменьшенных через сутки после родов.

30КГ - группа 30-суточных крыс из помётов средней численности (контрольная группа).

30МП – группа 30-суточных крыс из малочисленных помётов.

30УП – группа 30-суточных крыс из помётов средней численности, уменьшенных через сутки после родов.

14-30УП – группа 30-суточных крыс из помётов средней численности, уменьшенных через 14 суток после родов.

14-30КГ – группа 30-суточных крыс из помётов средней численности (контрольная группа к группе 14-30УП).

ВНД – высшая нервная деятельность.

ГМ – головной мозг.

НАДН-Д – никотинамидадениндинуклеотид-дегидрогеназа.

НАДФН-Д – никотинамидадениндинуклеотид-фосфат-дегидрогеназа.

ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт.

ПТД – переднетеменная доля.

СТД – собственно теменная доля.

СА1 – поле 1 гиппокампа.

Подписано в печать 21.10.2022. Формат 60×84/16.
Бумага офсетная. Усл. печ. 1,28. Уч.-изд. л. 1,42.
Тираж 100 экз. Заказ № 132.

Отпечатано в типографии издательства ФГБОУ ВО ДВГМУ.
680000, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35.